

ZUR DUALISTISCHEN WIRKUNGSWEISE
DES PROTEINASEN-INHIBITORS TRASYLOL
IM BLUTGERINNUNGS-FIBRINOLYSE-SYSTEM

Ursula Jaumann

1977

Dissertations- und Fotodruck Anneliese SCHUBERT
8 München 5 • Corneliusstraße 21 • Tel.: 268177

Aus dem Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie
der Universität München

Komm. Leiter: Prof. Dr. Hans Fritz

ZUR DUALISTISCHEN WIRKUNGSWEISE DES PROTEINASEN-INHIBI-
TORS TRASYLOL IM BLUTGERINNUNGS-FIBRINOLYSE-SYSTEM



Inaugural-Dissertation zur Erlangung
der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig-Maximilians-Universität
zu München

vorgelegt von
Ursula Jaumann
aus
Augsburg

München 1977

Mit Genehmigung des Fachbereiches Medizin der Universität
München

Berichterstatter: Prof. Dr. Hans Fritz

Dekan: Prof. Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 26.4.1977



Einleitung

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Meiner Familie

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

Die vorliegende Arbeit ist eine Zusammenfassung der Ergebnisse der Untersuchungen über die Wirkung von ...

INHALTSVERZEICHNIS

Verzeichnis der im Text verwendeten Abkürzungen

- 1 Einleitung und Aufgabenstellung
 - 2 Biochemie und Pharmakologie der behandelten Substanzen
 - 2.1 Trasylol (Proteinaseinhibitor aus Rinderlunge)
 - 2.1.1 Biochemie des Trasylol
 - 2.1.2 Pharmakologie des Trasylol
 - 2.2 Plasmin
 - 2.3 Plasmakallikrein
 - 3 Beziehung des Trasylol zum Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystem auf Grund neuester Erkenntnisse und daraus abgeleitete therapeutische Möglichkeiten
 - 3.1 Trasylol und das Blutgerinnungs- und Fibrinolysesystem
 - 3.2 Therapeutische Möglichkeiten
 - 4 Zusammenfassung
 - 5 Literaturverzeichnis
- Lebenslauf

VERZEICHNIS DER IM TEXT VERWENDETEN ABKÜRZUNGEN

M _r	Molekulargewicht
AS	Aminosäure
HF	Hageman-Faktor
I.P.	Isoelektrischer Punkt
KIE	Kallikreininhibitor-Einheit
HMW-Kininogen	High molecular weight Kininogen
LMW-Kininogen	Low molecular weight Kininogen
I - XIIa	aktivierte Blutgerinnungsfaktoren
TAME	Tosyl-arginin-methylester
BAEE	Benzoyl-arginin-18-äthylester
BAPA	Benzoyl-arginin-p-nitroanilid
mIU	milli-Inhibitor-Unit

ZUR DUALISTISCHEN WIRKUNGSWEISE DES PROTEINASEN-INHIBITORS TRASYLOL IM BLUTGERINNUNGS-FIBRINOLYSE-SYSTEM

1 Einleitung und Aufgabenstellung

Trasylol wurde 1930 von Frey, Kraut und Werle als Hemmstoff des Kallikreins entdeckt (1). Die sich daran anschließende intensive Erforschung der Eigenschaften des Trasylol eröffnete zahlreiche Anwendungsmöglichkeiten in der klinischen Therapie. Das Interesse richtete sich dabei auf Erkrankungen und pathologische Gewebsveränderungen, an deren Entstehung proteolytische Enzyme beteiligt sind. Die Hauptanwendungsgebiete für Trasylol in der Klinik liegen demgemäß bei entzündlichen Vorgängen, insbesondere der akuten Pankreatitis und der Peritonitis, bei verschiedenen Schockformen, in der Traumatologie, sowie bei hyperfibrinolytischen Zuständen und bei Gerinnungsstörungen. Die therapeutische Anwendung des Trasylol bei diesen verschiedenartigen Krankheitserscheinungen war und ist nicht unumstritten und die Meinungen über seine therapeutische Wirksamkeit gingen und gehen teilweise noch weit auseinander.

Die therapeutische Wirksamkeit von Trasylol beruht auf seinen antienzymatischen Eigenschaften. Zahlreiche Untersuchungen haben gezeigt, daß Trasylol außer den Kallikreinen die Pankreasenzyme Trypsin und Chymotrypsin sowie das Plasmin zu hemmen vermag, bzw. deren Aktivierung aus ihren Vorstufen verhindern kann. Die ersten gezielten Einsatzmöglichkeiten in der Klinik boten sich an bei der akuten Pankreatitis (2) und bei hyperfibrinolytischen Blutungen in der Gynäkologie und Geburtshilfe (3,4). Im ersteren Fall stand dabei die Hemmung der Pankreasproteasen einschließlich des Kallikrein, im letzteren die Inhibierung des Plasmins im Vordergrund. Insbesondere der Einfluß des Trasylol auf die Fibrinolyse und Blutgerinnung wurde immer mehr zum Gegenstand des Interesses. Erste Versuche von R. Marx in München 1959 (5,6) gaben den Anstoß zu einer großen Anzahl von Untersuchungen in vielen Laboratorien. 1967 konnte P. Matis in einer klinischen Langzeitstudie deutlich den Einfluß des Trasylol auf die Blutgerinnung zeigen (7). Bei hoher Dosierung von Trasylol ergab sich in seinem Patientengut eine signifikante Verminderung der tödlich verlaufenen Lungenembolien. Bislang war es aber nicht gelungen, diese antithromboplastische Wirkung des Trasylol vom Wirkungsmechanismus her zu begründen. Erst durch in letzter Zeit gewonnene Erkenntnisse konnte man dafür ein biochemisches Fundament finden.

Meine Aufgabe im Rahmen der vorliegenden Arbeit war es, die auf Grund neuester Forschungsergebnisse erhaltenen Erkenntnisse über die Beziehung des Trasylol zum Blutgerinnungs-Fibrinolyse-System im Gesamtzusammenhang darzustellen und Überlegungen über die jeweils wirksamste Dosierung des Trasylol anzustellen.

2 Zur Biochemie der behandelten Substanzen

2.1 Trasylol

2.1.1 Biochemie des Trasylol

Das Trasylol gehört zur Gruppe der im Tier- und Pflanzenreich weit verbreiteten Proteinase-Inhibitoren. Deren physiologische Funktion besteht darin, Gewebe vor dem Angriff eigener und fremder Proteasen zu schützen.

Gewonnen wird Trasylol aus Rinderorganen, die es in unterschiedlicher Konzentration enthalten. Bei Trasylol handelt es sich um ein basisches Polypeptid mit einem M_r von 6 513. Die Aminosäurezusammensetzung wird mit 58 Resten angegeben, wobei 16 verschiedene Aminosäuren beteiligt sind (8,9).

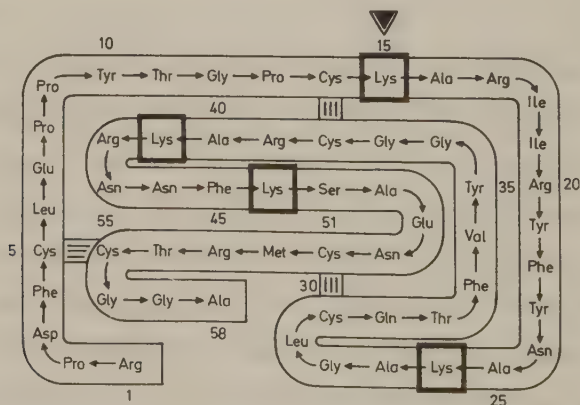
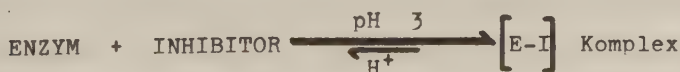


Abb.1 Aminosäuresequenz des Trasylol nach Laszkowski et al. (9)

Auf 10 basische kommen nur 8 saure Aminosäurereste; unter Berücksichtigung des Amidierungsgrades kommt man sogar auf ein Verhältnis basische zu saure Reste von 10:5. Daraus erklärt sich die relativ hohe Basizität des Trasylolmoleküls: der isoelektrische Punkt liegt bei pH 10,5. Diese hohe Basizität bedingt auch die starke Affinität des Trasylol zu negativ geladenen Substanzen, z.B. zu Mucoproteinen.

Trasylol besitzt ein sehr breites Hemmspektrum. Nach der zuerst entdeckten Hemmwirkung auf Kallikrein wurde in der Folge auch die auf Trypsin, Chymotrypsin und Plasmin entdeckt. Alle diese Enzyme gehören der Gruppe der Serin-Esterasen an. Bei den Kallikreinen ist dies allerdings bisher nur für das Pankreaskallikrein nachgewiesen, es gilt aber wahrscheinlich für alle Kallikreine (10). Von den Kallikreinen werden sowohl die in den Organen vorkommenden Kallikreine ($M_r = 28\ 000$), die eine sehr eingeschränkte Substratspezifität besitzen, als auch das Serumkallikrein mit etwas weniger eingeschränkter Substratspezifität ($M_r = 90\ 000$) gehemmt.

Mit den zuvor genannten vier Enzymen bildet Trasylol äquimolare Komplexe. Der Hemmbezirk des Inhibitor-moleküls lagert sich dabei an das reaktive Zentrum des jeweiligen Enzyms an und bildet einen inaktiven Enzym-Inhibitor-Komplex im Molverhältnis 1:1. Schematisch sieht dies folgendermaßen aus:



Das Inhibitor-molekül ist überaus stabil und jeglichem proteolytischen Abbau gegenüber äußerst resistent, was hauptsächlich seinem niedrigen Molekulargewicht und seiner kompakten Tertiärstruktur zuzuschreiben sein dürfte.

Den Forschungen und der Aufklärung der dreidimensionalen Struktur des Trasylol durch R. Huber und Mitarbeiter verdanken wir weiterführende Erkenntnisse (11). Seine Studien erbrachten den Nachweis, daß Trasylol Birnenform besitzt, daß der Großteil der negativ geladenen sauren Aminosäuren sich an der Basis des Moleküls befindet und die basischen, positiv geladenen an der Spitze, und daß auch der Lysin-15-Rest, das reaktive Inhibitor-Zentrum, sich an der Spitze des Moleküls befindet (s. Abb. 2). Die freie Aminogruppe des Lysin-15-Restes ist für die inhibitorische Wirkung gegenüber Trypsin von entscheidender Bedeutung (12), ebenso für die Kallikrein-hemmung. Das reaktive Zentrum des Trasylol, der Lysin-15-Rest, paßt genau in die Bindungstasche dieser Enzyme. Das hohe Dipolmoment und die exponierte Lage des reaktiven Zentrums des Trasyloilmoleküls begünstigen die rasche Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes. Salzbrücken und hydrophobe Wechselwirkungen bewirken eine hohe Assoziationskraft zwischen Enzym und Inhibitor. Nach neuesten Ergebnissen sind 12 Aminosäurereste des Trasyloilmoleküls, einschließlich des reaktiven Zentrums, mit Trypsin im Komplex verknüpft (8,11,Abb.2). Die treibende Kraft bei der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes ist die dabei freiwerdende Ener-

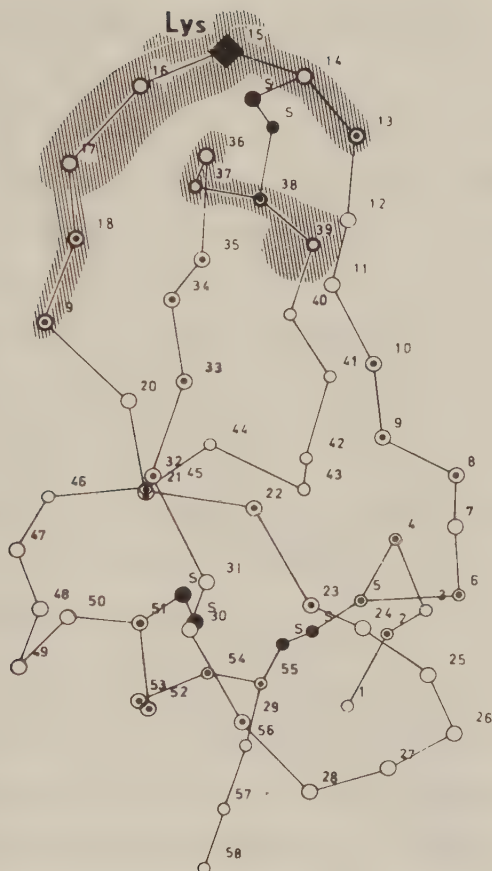


Abb.2 Dreidimensionale Struktur des Trasyol nach Huber et al. (11)
Die Aminosäuren, die bei der Bildung des Enzym-Inhibitor-Komplexes mit dem Enzym (z.B. Trypsin) in Kontakt kommen, befinden sich im schraffierten Bereich.

gie (14), zu der sämtliche Kontaktstellen beitragen.

Entscheidend für die Hemmspezifität eines Inhibitors ist normalerweise der Aminosäurerest im reaktiven Zentrum. Mit Hilfe dieses Restes kann er sozusagen zwischen verschiedenen Proteinen unterscheiden. Befinden sich basische Reste im reaktiven Zentrum des Inhibitormoleküls, handelt es sich meist um Inhibitoren, die Trypsin, Plasmin und evt. Kallikrein hemmen können. Chymotrypsininhibitoren besitzen normalerweise neutrale Reste im reaktiven Zentrum. Trasylol bildet hierbei eine Ausnahme, da es alle vier genannten Enzyme hemmen kann. Die Aminosäureanordnung im reaktiven Zentrum einiger strukturhomologer Inhibitoren gibt die Tabelle 1 wieder.

Wichtig für unsere Betrachtungen ist die Tatsache, daß es Inhibitoren verschiedenen Ursprungs gibt, die zwar eine starke Hemmkraft gegenüber Plasmin besitzen, die aber weder glanduläre noch plasmatische Kallikreine hemmen (Tab.2). Diese Inhibitoren können als sehr hilfreiches Mittel eingesetzt werden, um in komplizierten Systemen wie der Blutgerinnung oder der Fibrinolyse zu erkennen, an welchen Teilschritten innerhalb dieser Systeme Plasmin und/oder Kallikrein beteiligt ist. Bei Applikation eines Inhibitors mit einem breiten Hemmspektrum, z.B. von Trasylol, läßt sich schwerlich eine Aussage über die ablaufenden molekularen Mechanismen in diesem System treffen, da Trasylol sowohl Plasmin als auch Kallikrein hemmen kann.

Tab.1 Position der AS-Reste in den reaktiven Zentren von strukturell verwandten ("Kunitz-Typ") Trypsin-Chymotrypsin-Inhibitoren (s. l.c. 35)

Herkunft des Inhibitors	Position der AS-Reste										Hemmung von	
	P ₃	P ₂	P ₁	P ₁	P ₁	P ₁	P ₁	P ₁	P ₁	P ₂₄	Plasmin	Kallikreinen Organe Plasma
	13	14	15	16	17	18	38	39				
Trasylol ^a	Pro	CYS	Lys-Ala	Arg	Ile	CYS	Arg				++	+
Seeanemonen, 5II	Pro	CYS	Arg-Ala	Arg	Phe	CYS	Arg				++	+
Schnecken, K	Pro	CYS	Lys-Ala	Ser	Phe	CYS	Arg				++	+
Russel's Viper II	Arg	CYS	Arg-Gly	His	Leu	CYS	Gly				++	++
Rindercolostrum	Pro	CYS	Lys-Ala	Ala	Leu	CYS	Gln				++	-
Sofjabohnen (Kun.) ^b	Ser	Tyr	Arg-Ile	Arg	Phe						++	++

a s. auch Abb.2

b strukturell nicht verwandt

++ = starke Hemmung
+ = schwächere Hemmung
- = keine Hemmung
Ø = nicht aufgeklärt

Die detaillierte Charakterisierung der angegebenen Inhibitoren ist an folgenden Stellen einzusehen: (32-34)

Tab.2 Dissoziationskonstanten K_i [nM] menschlicher Plasmin- und Plasmakallikrein-Inhibitor-Komplexe (s.l.c.35)

Herkunft des Inhibitors	Struktur- typ	Plasmin	Kallikrein
Trasylol	Kunitz	0,2	100
Seeanemonen, &II	Kunitz	0,2	~100
Sojabohnen, Kunitz- Trypsin-Inhibitor	speziell	0,5	5
Blutegel, Bdellin A	unbekannt	0,7	-
Meerschweinchen- blasen, MSSII-II	Kazal	0,3	-
Rindercolostrum	Kunitz	~11	-
Limabohnen	speziell	>100	-

Die Dissoziationskonstanten ($K_i < 1 \times 10^{-9}$ M) wurden anhand der Titrationskurven der Enzyme nach der Methode von Green und Work bestimmt; auch die Methoden von Dixon und Lineweaver-Burk wurden angewandt ($K_i > 1 \times 10^{-9}$ M). Die detaillierte Charakterisierung der angegebenen Inhibitoren ist an folgenden Stellen einzusehen: (32-34). Die Inhibitoren vom Kunitz-Typ sind in Tab.1 aufgeführt.

Im Falle des Trasylol hilft uns jedoch die unterschiedliche Affinität dieses Inhibitors zu den beiden Enzymen weiter (s.Tab.2). Während schon eine $10^{-7}M$ Konzentration von Trasylol im Plasma eines Patienten eine erhebliche Einschränkung der Plasminaktivität und damit der Fibrinolyse erwarten läßt, wird die Kallikreinaktivität erst bei einer Trasylol-Konzentration von ca. 5×10^{-6} Mol/l therapeutisch signifikant vermindert. Dieser deutliche Unterschied im Hemmverhalten des Trasylol gegenüber Plasmin und Plasmakallikrein wird quantitativ erfaßt bei der Bestimmung der Dissoziationskonstanten der betreffenden Enzym-Inhibitor-Komplexe. In Tab.2 sind die entsprechenden Werte angegeben (35).

2.1.2 Pharmakologie des Trasylol

In erster Linie interessiert uns hier das pharmakokinetische Verhalten des Trasylol im Organismus. Nach i.v.-Injektion erfolgt zunächst ein steiler Abfall der Plasmakonzentration. Bereits 3 min nach Injektion befinden sich nur noch 20% des injizierten Inhibitors im Blut, nach 15 min weniger als 9% und nach 30 min p.I. nur noch etwa 4% (15). Dies ist dadurch bedingt, daß zuerst ein Verteilungsgleichgewicht erreicht wird, d.h., das Trasylol tritt aus dem Intravasalraum aus und verteilt sich im gesamten Organismus. Nach 30-40 min ist dieses Gleichgewicht eingestellt (Abb.3,4). Nach Erreichen einer gleichmäßigen Verteilung des Inhibitors auf Plasma und den

Extravasalraum beginnt die Rückdiffusion ins Blut nach Maßgabe des Verteilungsgleichgewichts.

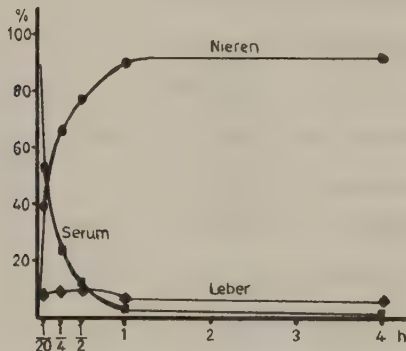


Abb.3 Verteilung von Trasylol nach i.v. Injektion von 18 000 KIE/kg Körpergewicht auf Blut (Serum), Leber und Nieren der Ratte

Ordinate: % Inhibitor, bezogen auf die jeweilige Inhibitormenge in Serum plus Leber plus Nieren = 100%

Abszisse: Zeitpunkt nach Injektion des Inhibitors

(s.l.c.15)

Trasylol verteilt sich überwiegend extrazellulär, dringt nicht in die Zellen ein und passiert auch nicht die Blut-Hirn-Schranke. Über die Eliminationshalbwertszeit des Trasylol existieren unterschiedliche Angaben. H. Kaller gibt

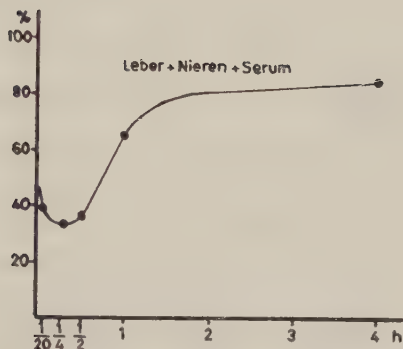


Abb.4 Zu verschiedenen Zeitpunkten in Blut (Serum) plus Leber plus Nieren von Ratten wiedergefundene Inhibitormenge, bezogen auf die insgesamt injizierte Trasylolmenge (18 000 KIE/kg Körpergewicht)

Ordinate: Inhibitormenge in %

Abszisse: Zeitpunkt nach Injektion des Inhibitors

(s.l.c.15)

sie mit 150 min an (16), E. Werle kommt auf 70 min (15, Abb.5). Es erfolgt jedenfalls eine sehr schnelle Elimination des Trasylol aus dem Körper. Um einen konstanten Blutspegel aufrecht zu halten, muß deshalb ständig Trasylol zugeführt werden. Ausscheidungsorgan für Trasylol ist die Niere. Sie besitzt ein selektives Speicherungsvermögen für Trasylol. 60 min nach Injektion

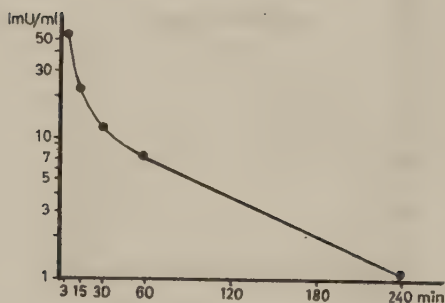


Abb.5 Trasylol-Blutspiegelkurve nach Injektion von 18 000 KIE/kg Körpergewicht bei Ratten

Ordinate: mIU/ml Serum (1 mIU entspricht 1,8 KIE)

Abszisse: Zeitpunkt nach Injektion

Nach F.H. Dost berechnete Eliminationshalbwertszeit: etwa 70 min

(s.l.c.15)

finden sich bereits über 60% und nach 240 min fast 90% der injizierten Inhibitormenge in den Nieren (Abb.3). Die in Leber und Muskeln gefundenen Konzentrationen entsprechen in etwa denen in der extrazellulären Gewebsflüssigkeit. Der in den Nieren angereicherte Inhibitor wird erst nach 12-24 Std. langsam wieder ausgeschieden und erreicht erst nach 5-6 Tagen die

Grenze der Nachweisbarkeit (17). Mit dem Endharn wird nur sehr wenig hemmaktives Trasylol ausgeschieden, etwa 5%. Auf Grund dieser Erkenntnisse über Verteilung und Ausscheidung des Trasylol kann man Berechnungen über die pharmakologisch wirksamsten Dosen von Trasylol anstellen.

Seit seiner Entdeckung wurde das Trasylol schon bei vielen Krankheiten therapeutisch eingesetzt, aber nur bezüglich seiner antifibrinolytischen Wirksamkeit konnten eindeutige Befunde hinsichtlich des Wirkungsmechanismus erhoben werden. Trasylol hemmt das proteolytisch aktive Plasmin und somit die Endstufe der Fibrinolyse. Trasylol besitzt somit einen anderen Wirkungsmechanismus als die synthetischen Antifibrinolytika wie Tranexamsäure (AMCHA), ~~E~~-Aminocaprinsäure (EACA) und p-Aminomethylbenzoesäure (PAMBA), die nur die Neubildung von Plasmin verhindern können. Bereits vorhandenes Plasmin wird von ihnen nicht gehemmt.

Eine weitere wesentliche Eigenschaft des Trasylol ist seine hemmende Wirkung auf die Vorphase der Gerinnung über die Hemmung des Plasmakallikreins (s.S.28,29,38). Die Wirksamkeit des Thrombin selbst kann von Trasylol nicht mehr beeinflusst werden. In den üblicherweise gegebenen Dosen ist die gerinnungshemmende Wirkung des Trasylol jedoch gegenüber seiner antifibrinolytischen Wirksamkeit zu vernachlässigen. Auf die gerinnungshemmende Wirksamkeit des Trasylol wird später noch aus-

föhrlich eingegangen (s.S.38, 40).

2.2 Plasmin

Das proteolytisch wirksame, in der Fibrinolyse so bedeutsame Enzym Plasmin wird im Bedarfsfall aus seinem Proenzym, dem Plasminogen, gebildet. Unter Bedarfsfall ist die Auflösong abgelagerten Fibrins oder gebildeter Thromben zu verstehen. Bei Auftreten einer generalisierten Aktivierung der Fibrinolyse werden auch zirkulierendes Fibrinogen, die Gerinnungsfaktoren V und VIII und in geringerem Maß die Faktoren II, VII und X durch Plasmin gespalten. Dies bewirkt andererseits eine schwerwiegende Störung des Gerinnungssystems des Organismus und somit eine erhöhte Blutgerinnung.

Das menschliche Plasma enthält jedoch mehrere Proteinase-Inhibitoren, die das Plasmin zu hemmen imstande sind und eine evt. überschießende Reaktion verhindern können. Eine Übersicht über die im menschlichen Plasma vorhandenen Inhibitoren, deren Konzentration, Hemmspektren und wahrscheinliche Funktion geben die Tabellen 3 bis 5 wieder.

Die bisher bekannten Plasmininhibitoren α_2 -Makroglobulin, α_1 -Antitrypsin und $\overline{\text{C1}}$ -Inaktivator vermögen auch Plasma-Kallikrein zu hemmen (18,19). Ein weiterer, vor kurzer Zeit erst als Hemmstoff des Plasmin identifizierter Inhibitor mit einem M_r um

Tab.3 Konzentration und Eigenschaften der im menschlichen Plasma enthaltenen Inhibitoren nach Heimbürger et al., 1971

Inhibitoren	Abk.	mg/100 ml Mittelwert	M _r	Proteingehalt %	Zuckergehalt %
α_1 -Antitrypsin	α_1A	290,0 $\pm$ 45,0	54000	86	12,2
α_1 -Antichymotrypsin	α_1X	48,7 $\pm$ 6,5	69000	73	24,6
Inter- α -Trypsin-inhibitor	α_1I	50,0	160000	90	8,4
Antithrombin III	ATIII	23,5 $\pm$ 2,0	65000	85	13,4
α_1 -Inaktivator	α_1INA	23,5 $\pm$ 3,0	104000	65	34,7
α_2 -Makroglobulin	α_2M	260,0 $\pm$ 70,0	725000	92	7,7

Tab. 4 Hemmspektren der plasmatischen Proteinase-Inhibitoren im Blut-gerinnungs-Fibrinolyse-System nach N. Heimburger (18)
Abkürzungen s. Tab. 3

Proteinasen		Inhibitoren						
Name	Funktion	$\alpha_1 A$	$\alpha_1 X$	III I	AT	III	<u>CI</u> INA	$\alpha_2 M$
Thrombin F Ila		-	-	-	+		-	+
Gerinnungs-F Xa		-	-	-	+		-	-
Gerinnungs-F XIa	Koagulation	-	-	-	?		+	-
Gerinnungs-F XIIa		-	-	-	-		+	-
Plasmin	Fibrinolyse	+	-	-	schwach		+	+
C1 r		-	-	?	-		+	-
C1 s	Komplement	-	-	?	-		+	-
Präkallikrein-aktivator								
Plasmakallikrein	Kallikrein	+	-	-	-		+	+

Tab.5 Wahrscheinlichste Funktion der wichtigsten Proteinase-Inhibitoren im Blutgerinnungs-Fibrinolyse-System nach N. Heimbürger (18)

Inhibitor	Funktion	Pathologie
$\overline{\text{C1}}\text{INA}$	Aktiv.Kontrolle von: Blutgerinnung, Fibrinolyse, Kallikrein, Komplement	Angeborenes angioneurotisches Ödem: Schwellung von Haut und Schleimhäuten bei abgeschwächtem oder funktion. inaktiv. Inhibitor
AT III α_2^M	Örtl. Begrenzung der Blutgerinnung	Bei angeborenem Fehlen von AT III: Thrombembolien Bei Verbrauch von AT III: Hyperkoagulabilität
α_2^M $\overline{\text{C1}}\text{INA}$ α_1^A	Begrenzung des fibrinolytischen Abbaus zu pathologischen Substraten	Verbrauch von α_2^M während einer fibrinolytischen Therapie
α_2^M α_1^A $\text{I}\alpha\text{I}$	Kontrolle von Infektionen und Entzündungen nach Maßgabe der beteiligten Proteinase, deren Neutralisation und Ausscheidung. Verhinderung von Autodigestionsprozessen und Nebenreaktionen im Blutgerinnungssystem	Angeborener α_1^A -Mangel: Lungenemphysem Lokaler Verbrauch während: akuten Entzündungen, Nasenschleimhautentzündungen, rheumatischer Arthritis, Verbrennungen, Leukämie, Endotoxinschock

75 000 bewirkt, wie α_2 -Makroglobulin und $\overline{C1}$ -Inaktivator, eine sofortige Hemmung des Plasmin (20), hemmt Kallikrein jedoch nicht.

Bei physiologischerweise ablaufenden fibrinolytischen Prozessen wird das Plasminogen über Aktivatoren, deren Herkunft Zahl und Funktionsweise noch nicht endgültig geklärt ist, zu einem enzymatisch-fibrinolytisch wirksamen Enzym umgewandelt. Eine Vielzahl bakterieller und tierischer Substanzen ist imstande menschliches Plasminogen schnell und unmittelbar zu aktivieren. Bekannte und häufig benutzte Aktivatoren sind die Streptokinase, Urokinase, Trypsin, Schweineherzaktivator, Kaninchenierenaktivator und Staphylokinase (21). Auch in menschlichen Geweben und Körpersäften wurden Aktivatoren bzw. ihre Vorstufen, genannt Proaktivatoren, gefunden, so z.B. in Uterus, Prostata, Lunge oder Harn.

Der Erforschung der körpereigenen Aktivatoren des Plasminogens gilt weiterhin großes Interesse; in jüngster Zeit wurden viele neue Ergebnisse diesbezüglich bekannt. Die Synthese menschlicher Plasminogen-Aktivatoren erfolgt demnach in den Gefäßwänden; sie wird durch Hormone (anabole Steroide) stimuliert; die Freisetzung ins Blut steuert ein eigenes "releasing hormon" (22). Dieser aus dem Gefäßendothel stammende Proaktivator wird als extrinsic factor bezeichnet, während ein zweiter, im Plasma vorkommender Aktivator intrinsic factor genannt wird.

Letzterer wird durch den Hageman-Faktor aktiviert (23). Die wichtige Rolle des Hageman-Faktors bei der Plasminogenaktivierung war schon seit längerer Zeit bekannt (24), ebenso wie seine wesentliche Funktion in der Blutgerinnung und bei der Kininbildung (25,26). Einen schematisch vereinfachten Überblick über die Rolle des Hageman-Faktors im Blutgerinnungs-Fibrinolyse-System gibt die Abbildung 3.

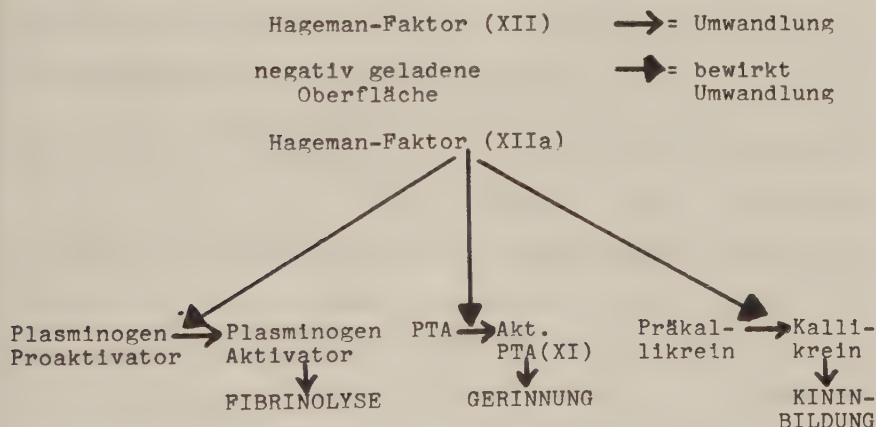


Abb.3 Die zentrale Stellung des Hageman-Faktor im Blutgerinnungs-Fibrinolyse- und Kininbildenden System nach M.E. Webster et al. (27)

PTA = Plasma-Thromboplastin-antecedent

Die Plasminogenkonzentration im menschlichen Plasma beträgt für Erwachsene 206 ± 36 $\mu\text{g/ml}$ und für Neugeborene bis zu 10 Tagen 90 ± 24 $\mu\text{g/ml}$ (21). Menschliches Plasminogen in seiner monomeren Form weist ein M_r von 87 000 auf und besteht aus einer einzigen Polypeptidkette mit 650 Aminosäureresten (19).

Die Aktivierung des menschlichen Plasminogens erfolgt in zwei Schritten: Ausgehend vom nativen Plasminogen (N-terminale AS ist Glutaminsäure = Glu-Plasminogen = Plasminogen A) kommt es im ersten Schritt durch Abspaltung eines Peptids zur Bildung eines modifizierten Proenzym (mit Lysin als N-terminale AS = Lys-Plasminogen = Plasminogen B) (28). Im zweiten Schritt wird dieses modifizierte Proenzym dann sehr rasch durch erneute Spaltung an einer weiteren Stelle der Peptidkette zum fibrinolytisch wirksamen Plasmin aktiviert (Abb.4) (29). Das aktive Plasmin besitzt ein M_r von $\sim 75\,400$. Es setzt sich zusammen aus zwei Ketten, einer hochmolekularen ($M_r \sim 60\,000$) und einer niedermolekularen ($M_r \sim 25\,000$), die durch eine Disulfidbrücke miteinander verbunden sind (30). Das aktive Zentrum von Plasmin befindet sich im niedermolekularen Anteil und zwar in einer sog. Histidinschleife, wie sie in ähnlicher Weise auch bei anderen Serinproteinasen (Trypsin, Chymotrypsin, Elastase) gefunden wurde (19). Die Spaltspezifität des Plasmin erstreckt sich auf alle Eiweiße, vor allem natürlich auf Fibrin und auf synthetische Arginin- und Lysin-

derivate wie z.B. Tosyl-arginin-methylester (TAME), Benzoyl-arginin-18-Äthylester (BAEE) und Benzoyl-arginin-p-nitroanilid (BAPA). Auch Kininogen wird von Plasmin gespalten, jedoch entschieden langsamer als von Kallikrein.

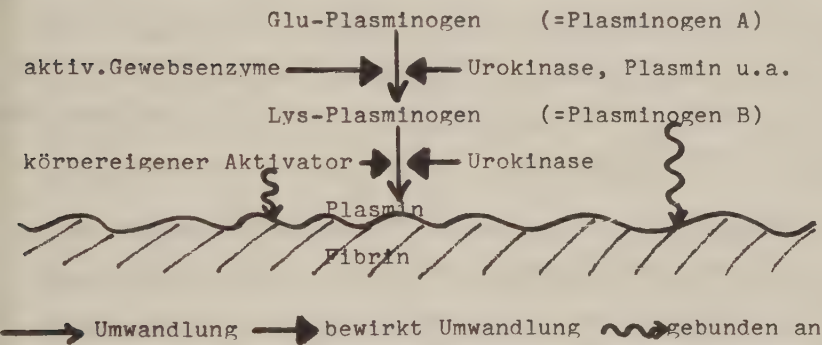


Abb. 4 Schema der Plasminogenaktivierung

2.3 Plasmakallikrein

Die Benennung Kallikrein stammt aus dem Griechischen (καλλίкреας = Bauchspeicheldrüse), da als Produktionsstätte des Kallikrein zuerst das Pankreas vermutet wurde. Dies trifft für das Pankreaskallikrein, wie wir heute wissen, auch zu. Die

Synthese des Plasmakallikrein findet jedoch in der Leber statt.

Das Kallikrein-Kinin-System gehört mit seinen Vorstufen, seinen freiliegenden und spaltenden Enzymen sowie seinen Inhibitoren zu den humoralen Faktoren, die den Ablauf vieler körpereigener Funktionsabläufe regeln (31). Kallikrein ist heute die allgemeine Bezeichnung für Serinproteasen, die physiologischerweise in begrenzter Proteolyse vorzugsweise Kinine aus deren Vorstufen, den Kininogenen, freisetzen können (36). Die inaktiven Vorstufen der Kallikreine werden als Kallikreino gene oder Präkallikreine bezeichnet.

Das in dieser Arbeit besprochene Plasmakallikrein kann seine Wirkung im gesamten Organismus entfalten, während die Organkallikreine (Pankreas, Niere, Mundspeicheldrüsen, Darm) wahrscheinlich nur örtlich begrenzte Wirkung besitzen. Die Wirkung der Organkallikreine beschränkt sich dabei weitgehend auf die enzymatische Freisetzung der Kinine aus dem LMW-Kininogen, ihrem natürlichen Substrat. Von den Kininogenen existieren im Plasma zumindest zwei Typen, ein hochmolekulares (HMW-Kininogen, Substrat des Plasmakallikreins) und ein niedermolekulares (LMW-Kininogen), die dementsprechend auch unterschiedliche Funktionen besitzen (27).

Die Wirkungen der durch die Kallikreine freigesetzten Kinine sind vielfältig und komplex. Im Vordergrund steht die Wirkung

auf den Blutkreislauf. Kinine verursachen eine Dilatation von Kapillaren und Arteriolen, eine Erregung der glatten Muskulatur, eine Erhöhung der Kapillarpermeabilität und sie lösen Schmerzempfindungen aus.

Das Plasmakallikrein unterscheidet sich von den Organkallikreinen außer im Molekulargewicht auch grundsätzlich in seiner Spaltspezifität. Neben der Kininfreisetzung aus dem HMW-Kininogen setzt es noch ein weiteres biologisch hochaktives Polypeptid (Inhibitor der Aktivierung des Hageman-Faktors) aus dem HMW-Kininogen frei und aktiviert den Hageman-Faktor. Letzterer stellt demnach ebenfalls ein natürliches Substrat des Plasmakallikreins dar. Das Plasmakallikrein ist hinsichtlich dieser Wirkungsweise den Gerinnungsfaktoren zuzurechnen. Da es in begrenztem Umfange auch andere Eiweiße zu spalten vermag, ist es in seinen Eigenschaften insgesamt dem Plasmin ähnlicher als den Organkallikreinen. Ähnlich wie Plasmin spaltet es auch BAEE und TAME sowie BAPA. Letzteres wird von den Organkallikreinen praktisch nicht hydrolysiert.

Hochgereinigte Präparationen von Plasmakallikrein haben sich als sehr instabil erwiesen. Deshalb sind die Angaben über die bisher bekannten Plasmakallikreine nicht übereinstimmend, was nicht zuletzt auch auf unterschiedliche Aktivierungs- und Isolierungsmethoden zurückzuführen ist. So fanden Morija und Hojima bei Acetonaktivierung vier Kallikreine mit isoelektri-

schen Punkten bei pH 7,8, 6,9, 6,5 und 4,5, bei Aktivierung durch Aussalzen jedoch nur ein einziges Kallikrein (I.P. bei pH 4,5) und bei Kaseinaktivierung zwei Kallikreine (I.P. bei pH 4,3 und 4,6) (37). Die Molekulargewichte der verschiedenen Präparate bewegten sich zwischen 74 000 und 113 000. In etwa vergleichbare Ergebnisse erhielten Sampaio et al., die Plasmakallikrein aus der Cohn-Fraktion IV-1 durch Affinitätschromatographie über Sojabohneninhibitor- und Benzamidin-Sepharose gewannen. Das durch diese Methode gewonnene, hochgereinigte Plasmakallikrein hat ein M_r von 95 000 (36). Das von Fritz et al. ebenfalls aus der Cohn-Fraktion IV isolierte Plasmakallikrein wies ein M_r von 90 000 auf. Zur Isolierung mittels Affinitätschromatographie war von diesen Autoren eine Trasylol-Sepharose verwendet worden. In der Gel-Elektrophorese zeigten sich zwei Protein-Banden (38).

Im menschlichen Blut existieren mehrere natürliche Hemmstoffe des Plasmakallikreins: das α_2 -Makroglobulin, der $\overline{C1}$ -Inaktivator und das α_1 -Antitrypsin (vgl. Tab.4). Auch das Antithrombin III kann in Gegenwart von Heparin als Cofaktor als Hemmstoff des Kallikrein wirksam werden. Physiologischerweise sind offensichtlich nur das α_2 -Makroglobulin und der $\overline{C1}$ -Inaktivator für die Kallikreininhibierung bedeutsam, da nur diese beiden Hemmstoffe entsprechend rasch mit Kallikrein zu reagieren vermögen.

An körperfremden Hemmstoffen ist an erster Stelle das Trasylol

zu nennen und strukturell Verwandte des Trasylol, wie die aus Seeanemonen und aus Schlangengiften gewonnenen Inhibitoren, bzw. der Sojabohneninhibitor (vgl. Tab.1). Letzterer ist der z. Zt. stärkste bekannte körperfremde Inhibitor des Plasmakallikreins.

3 Beziehungen des Trasylol zum Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System auf Grund neuester Erkenntnisse und daraus abgeleitete therapeutische Möglichkeiten

3.1 Trasylol und das Blutgerinnungs- und Fibrinolyse-System

In den zur Zeit noch allgemein gültigen Schemata der Blutgerinnung und auch der Fibrinolyse wird die enge Verknüpfung des Plasmakallikreins und seiner Substrate, dem HMW-Kininogen und Hageman-Faktor, untereinander und damit ihre zentrale Stellung bei der Aktivierung der Blutgerinnung und Fibrinolyse noch nicht berücksichtigt. Auch die diesbezüglichen Kenntnisse über die Rolle des Faktors XII oder HF waren bislang lückenhaft. Abb. 3 gibt die bisherigen Vorstellungen über die Wirkungsweise des HF wieder. Diese Vorstellungen müssen auf Grund neuester Forschungsergebnisse wesentlich geändert werden, wobei neue Bezüge zu berücksichtigen sind.

Offensichtlich kommt dem Plasmakallikrein eine zentrale Stellung sowohl in der Blutgerinnung als auch in der Fibrinolyse zu. Zusammen mit seinem Substrat im engeren Sinne, dem HMW-Kininogen, beeinflusst Kallikrein in starkem Maße die Aktivierung des HF. Der aktivierte Hageman-Faktor (HF_a) seinerseits beeinflusst die Fibrinolyse durch die Aktivierung des Plasminogen-Proaktivators. Diese komplizierten Zusammenhänge

versucht die Abb.5 zu verdeutlichen.

Zwei Möglichkeiten der Aktivierung des Hageman-Faktors, die sich wahrscheinlich ergänzen, sind bisher beschrieben worden (26,39,40): Die erste Möglichkeit ist die "solid-phase"-Aktivierung des HF, wobei dieser an negativ geladene Oberflächen adsorbiert wird. Während dieses Vorgangs wird die HF-Molekülkonformation in noch nicht bekannter Weise verändert, die Peptidkette jedoch nirgends gespalten. Letzteres geschieht im Rahmen der zweiten Möglichkeit der HF-Aktivierung, der "fluid-phase activation". Bei dieser Form der Aktivierung kommt es durch die Einwirkung proteolytischer Enzyme, besonders des Kallikreins und Plasmins, zur Spaltung der Peptidkette an zwei Stellen. Die aus dem aus einer einzigen Polypeptidkette bestehenden HF-Molekül ($M_r \sim 80\,000$, Konzentration im menschlichen Serum: $29\,\mu\text{g/ml}$) entstandenen Bruchstücke weisen M_r von $52\,000$, $40\,000$ und $28\,000$ auf. Die Aktivierung des HF durch Plasmakallikrein und somit seine Spaltung in enzymatisch aktive Bruchstücke wird in Gegenwart des HMW-Kininogens noch wesentlich beschleunigt (58). Die Fähigkeit der Präkallikreinaktivierung kommt andererseits besonders dem $28\,000$ -HF-Fragment zu (26). Somit wird eine Reaktionskette in Gang gesetzt, die im Sinne eines positiven feedback sich selbst beschleunigt.

Zur Aktivierung des HF an negativ geladenen Oberflächen sind

evt. noch andere, bisher nicht identifizierte Faktoren erforderlich (41,42). Geklärt ist jedoch die Beteiligung von Kallikrein und HMW-Kininogen. Das Plasma von Patienten mit einem Mangel an Präkallikrein (Fletcher trait) zeigt pathologische Abweichungen (im Sinne von Verzögerungen) im HF-abhängigen Teil der Blutgerinnung, Fibrinolyse und Kininbildung (43,44). Im Plasma anderer Patienten fand sich ein allerdings sehr seltener Defekt, ein Mangel an HMW-Kininogen (Fitzgerald trait). Diese Patienten zeigen noch gravierende Störungen in der Blutgerinnung (starke Verzögerung), die nur durch die Gabe von HMW-Kininogen behoben werden können (45,46). Der Anteil des HMW-Kininogen an der im menschlichen Plasma enthaltenen Gesamtmenge an Kininogen beträgt etwa 20% (47). Durch die Aufdeckung dieser Mangelkrankheiten konnten die Vorgänge um die Aktivierung des HF an negativ geladenen Oberflächen somit weiter aufgeklärt werden.

Abbildung 5 zeigt das Zusammenspiel von Kallikrein und HMW-Kininogen bei der Aktivierung des Hageman-Faktors (48). HF, Präkallikrein und HMW-Kininogen sind gleichzeitig als "Komplex" an die negative Oberfläche adsorbiert (27,48). Dabei kommt es unter wesentlicher Mitwirkung des HMW-Kininogens zur Bildung einer anfangs nur geringen Menge des aktiven HF; die gebildeten Spaltprodukte (Präalbuminfragmente), vor allem das 28 000 M_r -Fragment, bewirken nun die Aktivierung des Präkallikreins durch limitierte Proteolyse. Das somit freige-

setzte Kallikrein bringt nun in Gegenwart des HMW-Kininogens erst die Aktivierung des HF entscheidend in Gang. Wie aus Abb.5 hervorgeht, kann kininfreies HMW-Kininogen durch natives ersetzt werden, ohne daß die Aktivierung entscheidend verzögert wird. Kallikrein setzt zusätzlich aus dem HMW-Kininogen Bradykinin und gleichzeitig ein bis zwei histidinreiche Peptide frei. Diese histidinreichen Peptide sind ihrerseits in der Lage, die Aktivierung des HF zu hemmen.

Die Kallikreinwirkung ist in Abb.5 durch eine gestrichelte Linie versinnbildlicht, da Kallikrein an negativ geladene Oberflächen gebundenen, hochgereinigten HF nur in Gegenwart von HMW-Kininogen aktivieren kann. Dieser Effekt ist wahrscheinlich auf eine Reaktion (Komplexbildung) zwischen nativem HMW-Kininogen und HF zurückzuführen, da weder das kininfreie noch intaktes HMW-Kininogen oder Kallikrein allein in Lösung den HF zu aktivieren vermögen (27). Die genaue Wirkungsweise des HMW-Kininogens ist dabei noch ungeklärt. Diskutiert wird eine enzymatische Spaltung des adsorbierten HF und eine damit verbundene Freilegung des aktiven Zentrums durch Vermittlung des HMW-Kininogens, Freilegung des aktiven Zentrums des HF beim Kontakt mit dem HMW-Kininogen durch eine, infolge der Assoziation induzierte Konformationsänderung des HF oder eine "Verstärkerwirkung" des HMW-Kininogens auf die katalytische Funktion des HF.

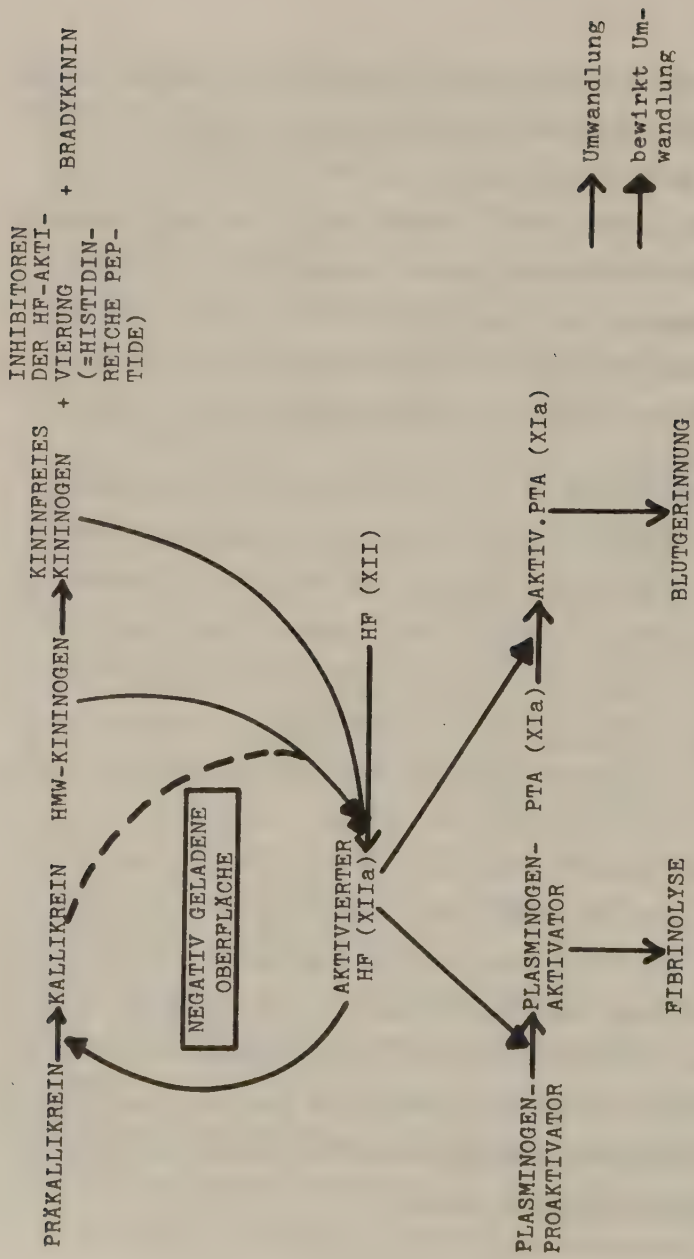


Abb.5 Schema der "solid phase"-Aktivierung des Hageman-Faktors nach M.E. Webster et al. "Konzertierte" Aktion des Kallikreins und HMW-Kininogens (oder kininfreien Kininogens) bei der Aktivierung des HF

Von den zwei im menschlichen Plasma vorhandenen Kininogenasen, Kallikrein und Plasmin, ist das Kallikrein die weitaus wirksamere. Plasmin ist ebenfalls in der Lage, Präkallikrein zu Kallikrein zu aktivieren, allerdings nur auf indirekte Weise. Man vermutete zwar zunächst eine direkte Wirkung des Plasmins auf das Präkallikrein (49,50), aber nachfolgende Studien zeigten, daß Plasmin den HF zum sog. Präkallikreinaktivator (28 000 M_r -Fragment) abbaut, der dann aus Präkallikrein das Kallikrein durch limitierte Proteolyse freisetzt (51,52).

Die Aktivierung des Präkallikreins durch Plasmin läuft demnach über ein enzymatisch aktives Fragment des HF. Letzteres kann auch den aktiven Plasminogenaktivator aus seiner Proenzymvorstufe freisetzen (53).

Diese jüngst gewonnenen Erkenntnisse demonstrieren eindrucksvoll die enge Verknüpfung des Kallikrein-Kinin-Systems mit dem Blutgerinnungs-Fibrinolyse-System. Die Abb.6 veranschaulicht den neuesten Stand der Forschungsergebnisse. Damit ist nun auch eine molekularbiologische Erklärung für den thromboplastischen Effekt hoher Trasylolkonzentrationen gegeben: die beobachtete embolieverhindernde Wirkung des Trasylol muß auf die Hemmung des Plasmakallikreins zurückgeführt werden, was wiederum die Freisetzung von Thrombin, d.h. die Gerinnung verzögert. Daraus ergeben sich Konsequenzen für eine gezielte Inhibitortherapie, auf die im nächsten Abschnitt näher eingegangen wird.

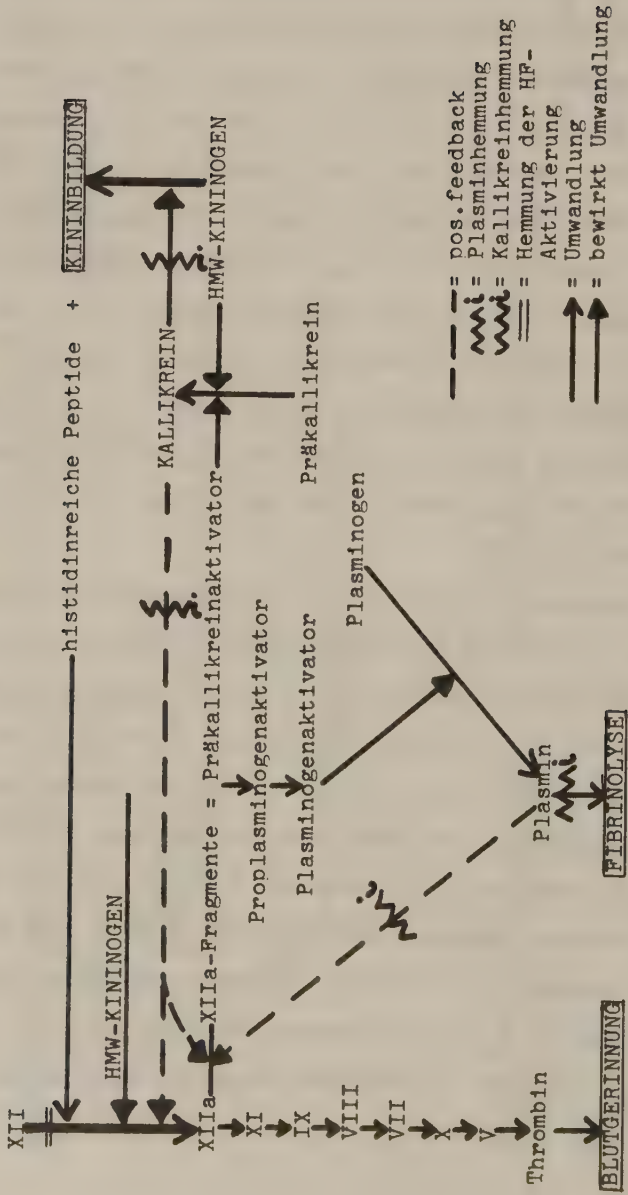


Abb. 6 Wirkungsweise und Hemmung von Kallikrein und Plasmin in Blutgerinnung und Fibrinolyse (s.l.c. 35)

3.2 Therapeutische Möglichkeiten

Normalerweise werden die hier besprochenen plasmatischen proteolytischen Systeme (Blutgerinnungs-Fibrinolyse-System, Kallikrein-Kinin-System) durch serumeigene Inhibitoren vor Entgleisungen geschützt (vgl. dazu Tab.3-5). Proteinase-Inhibitoren sind im menschlichen Plasma im Überschuss über das freisetzbare proteolytische Potential vorhanden und werden bei Erfordernis rasch wieder nachsynthetisiert. Dies zeigte sich z.B. bei Verbrennungspatienten, deren α_2 -Makroglobulinsatz deutlich erhöht war. Bei diesen Patienten ist die α_2 -Makroglobulinproduktion gesteigert, um den ständigen Verlust des α_2 -Makroglobulin an der verbrannten Fläche auszugleichen (54). Eine messbare Abnahme der im Plasma zirkulierenden Proteinase-Inhibitoren konnte allerdings nur unter extremen Bedingungen beobachtet werden, wie z.B. im Endotoxinschock oder bei der Leukämie. Ein lokal begrenzter übermäßiger Verbrauch von Proteinase-Inhibitoren konnte jedoch häufig festgestellt werden, z.B. bei hämorrhagischer Pankreatitis, Appendixperitonitis (55), bei Infektionen des oberen Respirationstraktes (56) und generell bei Infektionen und akuten Entzündungen (55).

Von den im menschlichen Plasma vorhandenen bekannten Proteinase-Inhibitoren - sieben sind bisher eindeutig identifiziert (18,20) - können drei sowohl Plasmin als auch Plasma-

kallikrein hemmen: α_1 -Antitrypsin, $\overline{\text{C1}}$ -Inaktivator und α_2 -Makroglobulin. Von diesen Inhibitoren bewirken $\overline{\text{C1}}$ -Inaktivator und α_2 -Makroglobulin eine sehr rasche Hemmung beider Enzyme (Soforthemmtyp), während α_1 -Antitrypsin nur sehr langsam inhibiert (Progresshemmtyp). Als der effektivste Plasminhemmstoff galt dabei bisher das α_2 -Makroglobulin. Vor kurzem wurde jedoch ein noch wirksamerer Plasmininhibitor, benannt Inter- α -Plasmininhibitor, entdeckt (20). Er scheint im Plasma zuerst mit freigesetztem Plasmin zu reagieren.

Die Funktion der genannten Inhibitoren besteht darin, eine übermäßig verstärkte Blutgerinnung und/oder Fibrinolyse zu verhindern. Bei stärkerer Ausprägung des pathologischen Zustandes wird es u.U. notwendig, Inhibitoren exogen zuzuführen. Das Trasylol bietet sich in diesem Fall als geeignetes Therapeutikum an, da es sowohl Plasmin als auch Plasmakallikrein zu hemmen vermag und auch bei hoher Dosierung gut verträglich ist. Auf Grund der unterschiedlichen Affinität des Trasylol zu Plasmin und Plasmakallikrein ist es dabei möglich, den gewünschten Effekt durch die Dosierung zu steuern. Bei Gabe von kleineren Mengen Trasylol (10^{-7} Mol/l Serum) wird weitgehend nur die Plasminaktivität gehemmt. Durch die Plasminhemmung kommt es zu keiner oder nur einer geringen Fibrinauflösung; außerdem wird die Bildung von XIIa-Fragmenten vermindert. Das bewirkt gleichzeitig eine Verlangsamung

der Plasminogenaktivierung, aber auch der Aktivierung des Hageman-Faktors (s. Abb. 6 und unten).

Bei Gabe von größeren Mengen Trasylol (5×10^{-6} Mol/l Serum) steht die Hemmung von Plasmakallikrein im Vordergrund, und zwar des bereits enzymatisch wirksamen Kallikreins. Dadurch wird die Aktivierung des Hageman-Faktors verhindert, sekundär auch die Bildung von XIIa-Fragmenten. Entscheidend ist, daß das endogene System der Blutgerinnung damit in seiner Wirksamkeit stark eingeschränkt wird: Durch die Blockierung der Aktivierung des Hageman-Faktors wird die Bildung von Faktor XIa und damit von Thrombin unterdrückt, somit also die Gerinnung (Thrombenbildung) entscheidend verzögert. Nachteilig ist jedoch die große Menge von Trasylol, die zu applizieren ist, wenn in der Blutbahn viel aktives Plasmakallikrein zirkuliert.

Berechnungen über therapeutisch jeweils wirksame Dosen von Trasylol (s. auch obige Konzentrationsangaben) unter Berücksichtigung seiner Eliminationshalbwertszeit (57) ergaben folgende Werte:

Um eine ausreichende Plasminhemmung zu erreichen, muß Trasylol in einer Menge von $0,5 - 1,0 \times 10^6$ KIE/Tag verabreicht werden. Die günstigste Applikationsform ist per infusionem, weil damit am ehesten ein gleichmäßiger Blutspiegel aufrecht erhalten werden kann.

Um jedoch eine ausreichende Kallikreinhemmung zu bekommen,

wäre die Applikation einer Menge Trasylol von $5-10 \times 10^6$ KIE/Tag optimal. Die Unbedenklichkeit der Verabreichung einer so hohen Trasyloldosis bei Risikopatienten ist jedoch noch nicht erwiesen. Derartige Dosierungen sollten deshalb zuerst im Tierversuch getestet werden.

Außer der Eliminationshalbwertszeit des Trasylol sind in diesem Zusammenhang auch die möglichen Reaktionen der beteiligten Enzyme in heterogener Phase zu beachten. Beim Plasminogen z.B. ist bekannt, daß es erst nach Adsorption an Fibrin durch den Plasminogenaktivator aktiviert wird (28,29), der seinerseits ebenfalls an Fibrin gebunden wird (s.Abb.4). Inwieweit das Trasylol hier ebenfalls spezifisch an Fibrin etc. gebunden wird, ist noch unbekannt. Die hier angegebenen Zahlen (KIE/Tag) können deshalb nur als Richtwerte verstanden werden. Genauere Berechnungen lassen sich erst dann durchführen, wenn die jeweils aktuelle Konzentration des betreffenden freien Enzyms und Inhibitors sowie des bereits komplexierten Anteils beider Partner exakt gemessen werden kann.

4 Zusammenfassung

Unser Wissen um die Rolle und die enge Verknüpfung des Kallikrein-Kinin-Systems innerhalb des Blutgerinnungs-Fibrinolyse-Systems wurde durch jüngste Forschungsergebnisse wesentlich erweitert. Die in diesem Zusammenhang genauer charakterisierten Substanzen, das Präkallikrein und das HMW-Kininogen, sind in enger Relation zur Wirkung des Hageman-Faktors zu sehen und gleich diesem als Gerinnungsfaktoren einzustufen. Die Interaktion dieser drei Moleküle an negativ geladenen Oberflächen bringt sowohl die Blutgerinnung als auch die Fibrinolyse in Gang. Das Kallikrein beschleunigt zusammen mit seinem Substrat, dem HMW-Kininogen, die Aktivierung des Hageman-Faktors und induziert so eine verstärkte Gerinnung. Andererseits wird über den aktivierten Hageman-Faktor - in sinnvoll ergänzendem Zusammenspiel - gleichzeitig auch die Fibrinolyse induziert. Präalbuminfragmente (=XIIa-Fragmente) verstärken die Bildung von Plasminogenaktivator und somit auch die Plasminfreisetzung. Das Plasmin wiederum beschleunigt die Bildung der Präalbuminfragmente und damit die Kallikreinaktivierung (vgl. Abb.5,6). Das Plasmakallikrein ist also in der Lage, außer der Kininfreisetzung aus HMW-Kininogen, auch den Hageman-Faktor und somit

die Blutgerinnung und Fibrinolyse zu aktivieren.

Auf Grund dieser neu gewonnenen Erkenntnisse über die engen Beziehungen zwischen dem Kallikrein-Kinin-System und dem Blutgerinnung-Fibrinolyse-System konnten auch die Inhibitor-therapeutischen Ansätze in diesen Systemen neu überdacht und theoretisch fundiert werden. Um die Affinität des Trasylols und einiger verwandter, natürlich vorkommender Inhibitoren zu Plasmin und Plasmakallikrein quantitativ zu erfassen, wurden die Ergebnisse hemmkinetischer Studien zugrunde gelegt. Basierend auf den Dissoziationskonstanten der entsprechenden Enzym-Inhibitor-Komplexe konnten die benötigten effektiven Inhibitormengen für die Anwendung in der Therapie errechnet werden. Dabei zeigte sich, daß die für die Hemmung von Plasmin benötigten Mengen von Trasylol wesentlich kleiner sind als die für eine effektive Hemmung des Plasmakallikreins notwendigen Inhibitor Dosen. Die Anwendung des Trasylols in der Therapie von Störungen innerhalb des Blutgerinnungs-Fibrinolyse-Systems erscheint auf Grund seiner dualistischen Wirkungsweise als sehr sinnvoll.

LITERATURVERZEICHNIS

- 1 Kraut, H., E.K.Frey, E.Werle: Z.physiol.Chem.192, 1 (1930)
- 2 Frey, E.K.: Zur Therapie der Pankreatitis. Therapiewoche 4: 323 (1954)
- 3 Hofbauer, H.: Hyperfibrinolytische Blutungen in der Geburtshilfe und Gynäkologie. In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie 1 (Hrsg. R.Gross, G.Kroneberg) F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart 1966
- 4 Ludwig, H.: Zur Anwendung von Trasylol in der Geburtshilfe und Gynäkologie. In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie 2 (Hrsg. R.Marx, H.Imdahl, G.L.Haberland) F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1968
- 5 Marx, R., P.Clemente, E.Werle, W.Appel: Blut 5, 367 (1959)
- 6 Marx, R.: Thrombos.Diathes.hämorrh. (Stuttgart) Suppl. ad Vol.II (1958)
- 7 Matis, P.: Wirkungen von Trasylol auf Blutgerinnung und Wundheilung. In: l.c.4
- 8 Vogel, R., I.Trautschold, E.Werle: Natural Proteinase Inhibitors. Academic Press, New York - London 1968

- 9 Proceedings of the International Research Conference on Proteinase Inhibitors, Nov. 1970 (Hrsg. H.Fritz, H. Tschesche) De Gruyter, Berlin - New York 1971
- 10 Fiedler, F., B.Müller, E.Werle: Z.physiol.Chem. 349, 942 (1968)
- 11 Huber, R., D.Kukla, A.Rühlmann, W.Steigemann in l.c. 9, S.56
- 12 Chauvet, J., R.Acher: J.biol.Chem.242, 4274 (1967)
- 13 Janin, J., R.M.Sweet, D.M.Blow: The mode of action of Soy bean trypsin inhibitor as revealed by cristal structure analysis of the complex with porcine trypsin. In: Bayer Symposium V - Proteinase Inhibitors (eds. Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., and Truscheit, E.) Springer Verlag, Berlin 1974
- 14 Blow, D.M.: Energetics of inhibitor binding. In l.c. 13
- 15 Werle, E.: Zur Biochemie des Trasylol. In: Neue Aspekte der Trasylol Therapie 3 (Hrsg. G.L.Haberland, P.Matis) F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1969
- 16 Kaller, H.: Pharmakologie des Trasylol. In: l.c.4
- 17 Trautschold, I., E.Werle, H.Fritz: Zur Biochemie des Trasylol. In: l.c.3

- 18 Heimbürger, N.: Properties and Role of Antiproteases. In: Lung Metabolism (eds. A.E.Junod, R. de Haller) Academic Press, New York - San Francisco - London 1975
- 19 Putnam, F.W.: Plasminogen and Plasmin. In: The Plasma Proteins, Vol.I, Academic Press, New York - San Francisco - London
- 20 Gallimore, M.J.: British Journal of Haematology 31, 217 (1975)
- 21 Robbins, K.C., Summaria, L.: Human Plasminogen and Plasmin. In: Methods of Enzymology, Vol.XIX (eds. G.E.Perlman, L. Lorand) Academic Press, New York - London 1970
- 22 Nilsson, I.M.: The Effect of Drugs on Activator Synthesis and Release. In: Third International Conference on Synthetic Fibrinolytic Thrombolytic Agents, Glasgow, Sept. 1976, Abstract 3
- 23 Kluft, C.: Levels of Plasminogen Activators in Human Plasma. In: l.c.22, Abstract 10
- 24 Steinbuch, M.: Molecular Properties of Plasminogen and Plasmin Activation and Inhibition Mechanism. In: Progress in Chemical Fibrinolysis and Thrombolysis, Vol.1 (Hrsg. J.F.Davidson, M.M.Samama, P.C.Desnoyers) Raven Press, New York C 1975

- 25 Werle, E.: History of Kallikrein and Some Aspects of Its Chemistry and Physiology. In: Kininogenases (eds. G.L. Haberland, J.W.Rohen) F.K.Schattauer Verlag, Stuttgart - New York 1973
- 26 Revak, S.D., C.G. Cochrane, A.R.Johnston, T.E.Hugli: The Journal of Clinical Investigation 54, 619 (1974)
- 27 Webster, M.E., J.A.Guimaraes, A.P.Kaplan, R.W.Colman, J. Pierce: Activation of Surface-Bound Hageman Factor: Pre-eminent Role of High Molecular Weight Kininogen and Evidence for a New Factor. In: Kinins, Pharmacodynamics and Biological Roles (eds. F.Sicuteri, N.Back, G.L.Haberland Plenum Press, New York - London 1976
- 28 Claeyss, H.: Mechanism of Inhibition of the Fibrinolytic System by 6-Amino-Hexanoic Acid and Related Compounds. I l.c. 22, Abstract 17
- 29 Wallen, P.: Chemistry of Plasminogen and Plasminogen Activation. In: l.c. 22, Abstract 13
- 30 Laursen, R.A., How-Ming Lee: FEBS Letters 56, 70 (1975)
- 31 Frey, E.K., H.Kraut, E.Werle: Das Kallikrein-Kinin-System und seine Inhibitoren. F.Enke Verlag, Stuttgart 1968
- 32 Fritz, H., Tschesche, H. (eds.)(1971) in l.c. 9 (vgl.S. 105,108,149,225,271)

- 33 Fritz, H., Tschesche, H., Greene, L.J., Truscheit, E.
(eds.) in l.c. 13 (vgl. S. 254,265,277,344)
- 34 Peeters, H. (ed.): Protides of the Biological Fluids -
23rd Colloquium. Pergamon Press, Oxford 1976 (vgl. S.
235,255,271,285)
- 35 Fritz, H.: Plasmin and Plasma Kallikrein Inhibition by
Trasylol and Related Inhibitors - Theoretical Consider-
ations. In: l.c. 22, Abstract 21
- 36 Sampaio, C., Show-Chu Wong, E. Shaw: Archives of Biochem.
and Biophys. 165, 133 (1974)
- 37 Moriya, H., Y.Hojima: Studies on Kinin-Forming Enzymes in
Human Plasma and their Heterogeneity. In: Vasoepitides
(eds. N.Back, F.Sicuteri), Plenum Publishing Corp. New York
- 38 Fritz, H.: Persönliche Mitteilung
- 39 Cochrane, C.G., S.D.Revak, R.Ulevitch, A.Johnston, D.
Morrison: Hageman Factor: Characterisation and Mechanism
of Activation. In: Chemistry and Biology of the Kallikrein-
Kinin-System in Health and Disease (eds. J.J.Pisano, K.F.
Austen) U.S.Gov.Printing Office, Washington D.C. 1976
- 40 Kaplan, A.P., H.L.Meier, L.D.Yecies, L.W.Heck: Hageman
Factor and its Substrates: The Role of Factor XI (PTA),
Prekallikrein and Plasminogen Proactivator in Coagulation,

Fibrinolysis and Kinin-Generation. In: l.c. 39

- 41 Webster, M.E., J.V.Pierce: Fed.Proc. 32, 845 (1973)
- 42 Saito, H., O.D.Ratnoff, V.H.Donaldson: Circ.Res. 34, 641 (1974)
- 43 Hathaway, W.E., C.P.Belhausen, H.S.Hathaway: Blood 26, 521 (1965)
- 44 Wuepper, K.D.: J.Exp.Med. 138, 1345 (1973)
- 45 Saito, H., O.D.Ratnoff, R.Waldman, J.P.Abraham: J.Clin. Invest. 55, 1082 (1975)
- 46 Wuepper, K.D., D.R.Miller, M.J.Lacombe: Fed.Proc. 34, 859 (1975)
- 47 Jacobsen, S., M.Kriz: Br.J.Pharmac.Chemother. 29, 25 (1966)
- 48 Schiffmann, S., P.Leeand, R.Waldman: Thromb.Res. 6, 451 (1975)
- 49 Vogt, W.: J.Physiol. 170, 153 (1964)
- 50 Haustein, K.O., F.Marquwardt: Acta Biol.Germ.16, 658 (1966)
- 51 Kaplan, A.P., K.F.Austen: J.Exp.Med. 133, 696 (1971)
- 52 Burrowes, C.E., H.Z.Movat, M.J.Soltay: Proc.Soc.Exp.Biol. Med. 138, 959 (1971)

- 53 Treloar, M.P., H.Pyle, A.H.Özge-Anwar, Y.Takeuchi, H.Z.
Movat: Eur.J.Immunol. 2, 338 (1972)
- 54 Farrow, S.P., S.Baar: Clin.Chim.Acta 46, 39 (1973)
- 55 Ohlsson, K.: Interaction between endogenous proteinases and
plasma protease inhibitors. In: l.c. 13
- 56 Reichert, R., K.Hochstrasser, E.Werle: Klin.Wschr.49,
1234 (1971)
- 57 Philipp, E.: Persönliche Mitteilung
- 58 Yecies, L., A.P.Kaplan: Hageman Factor Dependent Fibrino-
lysis in Human Plasma. In: l.c. 22, Abstr.9

Die vorliegende Arbeit wurde am Institut für Klinische Chemie und Klinische Biochemie der Universität München durchgeführt

Herrn Prof. Dr. Hans Fritz danke ich für die Überlassung des Themas, sein großes Interesse am Fortgang dieser Arbeit und für zahlreiche Anregungen und Unterstützungen, mit denen er die vorliegende Arbeit förderte.

Meinem Manne danke ich für seine unermüdliche Hilfestellung während der Fertigstellung dieser Arbeit.

LEBENS LAUF

- Geboren: 26.6.1946 in Augsburg
- Vater: Alexander Weisig, Verwaltungsangestellter i.R.
- Mutter: Dorothea, geb. Schaefer
- 1952-1956: Volksschule der Englischen Fräulein, Augsburg
- 1956-1959: Realgymnasium der Englischen Fräulein, Augsburg
- 1959-1966: Deutsches Gymnasium, St. Thomasschule, Wetttenhausen
Reifeprüfung Juli 1966
- WS 1966: Studium der Humanmedizin an der Universität München
- WS 1967/68: Naturwissenschaftliche Vorprüfung
- SS 1969: Ärztliche Vorprüfung
- 4.8.1972: Eheschließung mit Dr. Eugen Jaumann, Arzt
- 18.12.1972: Abschluß der ärztlichen Prüfung
- 1.2.73 - : Medizinalassistentin an der I. Medizinischen Klinik
30.4.73 : der Universität München
- 1.5.73 - : Medizinalassistentin im Dritten-Ordens-Krankenhaus
30.8.73 : Nymphenburg auf der II. Inneren Abteilung
- 1.10.73 - : Medizinalassistentin in der Klinik Dr. Decker auf
28.2.74 : der Chirurgischen Abteilung
- 28.2.74: Approbation als Arzt
- 21.9.74: Geburt unseres Sohnes Sebastian
- 30.10.75: Geburt unserer Tochter Stephanie

